



Molecular Biology and Biochemical Study of Lachrymatory Factor Synthase in *Allium cepa* L. (onion)

著者	正村 典也
その他のタイトル	タマネギ催涙因子合成酵素に関する分子生物学および生化学研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102乙第2656号
URL	http://hdl.handle.net/2241/120084

氏名（本籍）	正村 典也（愛知県）		
学位の種類	博 士（農学）		
学位記番号	博 乙 第2656号		
学位授与年月日	平成25年6月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Biology and Biochemical Study of Lachrymatory Factor Synthase in <i>Allium cepa</i> L. (onion) (タマネギ催涙因子合成酵素に関する分子生物学および生化学研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学教授（連携大学院）	医学博士	石田 直理雄
副査	筑波大学教授	農学博士	小林 達彦
副査	筑波大学講師	農学博士	根岸 紀

論 文 の 要 旨

タマネギ (*Allium cepa* L) の最も特徴的な特性は、組織破碎時の催涙性である。その催涙性は、タマネギ細胞質中に豊富に存在する含硫成分である (*E*)-(+)-*S*-(1-プロペニル)-*L*-システインスルホキシド (*E*)-PRENCISO) を基質とするアリイナーゼと催涙因子合成酵素 (LFS) による連続する 2 段階の酵素反応によって催涙因子 (プロパンチアール-*S*オキシド LF) が生成されるために引き起こされる。特に、タマネギの催涙成分生成の最終反応を触媒する LFS は、類似配列を有する酵素遺伝子がないことや、反応生成物である LF の化学構造が珍しいことから、ネギ属植物の中で保存・進化してきた特異な遺伝子であると考えられている。また、実用面からは、LFS 発現レベルを低下させることは“涙の出ないタマネギ”の作出につながるだけでなく、LF が生成されないことの副次作用として、健康機能性が期待される含硫成分の生成が進行することも報告されている。著者は、ネギ属植物に特異的な新奇酵素遺伝子であり、実用上の有用性も期待される LFS 遺伝子のゲノム構造、LFS タンパク質の生化学的特性や触媒反応の解明を目指し、本研究を実施した。

先ず著者は、LFS 遺伝子のゲノム構造に関して座上染色体の特定、マッピング研究、BAC クローンでの LFS 近傍塩基配列の比較、BAC-FISH、タマネギ系統間の LFS 配列比較、倍加半数体で発現している LFS 遺伝子の解析を進めた。その結果、タマネギ LFS 遺伝子が 5 番染色体長腕の近位領域のごく狭い範囲に局在する重複遺伝子であり、少なくとも 2 つの遺伝子座から転写されていることを明らかにした。

次いで著者は、LFS タンパク質の生化学特性に関して、チオアルデヒド *S*-オキシド生成反応を触媒する最初に報告された酵素である LFS の活性中心アミノ酸の同定を進め、71 番目のアルギニン (Arg) と 88 番目のグルタミン酸 (Glu) が LFS の酵素活性発現に不可欠なことを示した。さらに、アブシジン酸受容体 (PYL) を鋳型としたホモロジーモデリングによって LFS タンパク質の三次元構造モデルを示し、同定した 2 つのアミノ酸残基 (Arg71、Glu88) がその構造中のリガンド結合部位に相当する構造内に位置することを示した。

触媒反応の解明に関しては、(*E*)-PRENCISO、アリイナーゼ、LFS を重水 (D₂O) 中で混合すると、分子内の 1 つの水素が重水素化された催涙因子が生成されることを明らかにした。それに加えて、タマネギ LFS は(*E*)-PRENCISO のアリイナーゼ分解物からのみ催涙因子を生成し、(*Z*)-PRENCISO を基質に用いた時には催涙因子生成しないことを明らかとした。これらの結果から、タマネギ LFS が分子内 H⁺転移反応を触媒する (*E*)-1-プロペニルスルフェン酸イソメラーゼであることを示した。

審 査 の 要 旨

本研究において、機能している LFS 遺伝子が、タマネギ 5 番染色体上に複数コピー存在していることを見出したことは、巨大ゲノムを有する植物における構造遺伝子の重複について新たな視点を加えるものである。また、この発見は、突然変異手法による LFS 遺伝子欠失タマネギ系統の作出が難しいことを示唆するものでもある。さらに、LFS の活性中心アミノ酸の特定は、新奇な反応の触媒機構のアミノ酸残基レベルでの作用解明につながる知見である。

これまでに提唱されてきたタマネギ催涙因子の生成反応は、粗抽出の基質や酵素画分を用いた研究や、生理的条件から離れた高温下での反応研究からの推定結果であった。今回、精製された基質・酵素を常温・常圧下、重水中で反応させて催涙因子を生成させ、催涙因子生成反応が分子内 H⁺転移反応であることを明らかとし、これまで推定されていた反応モデルの正当性を示した。本研究は、タマネギ LFS に関して、ゲノム構成から始まり、その酵素タンパク質の活性中心アミノ酸の特定と立体構造解析、さらに、触媒する反応の詳細解析と続いている。ここから得られた知見は、植物の有用遺伝子解析、酵素化学、含硫成分の反応機構など、多岐にわたる研究分野でのさらなる発展が期待されるものである。

平成 25 年 4 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員の出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。